

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**  
**FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**

**Dottorato di Ricerca in Ambiente, Prevenzione e Medicina Pubblica,  
indirizzo Igiene Ambientale (XXIX ciclo)**



***TESI DI DOTTORATO***

***Valutazione degli effetti del Biossido di Cloro sulla disinfezione da  
Legionella nell'Azienda Ospedaliera Policlinico.***

***Coordinatore***  
***Prof. Claudio Buccelli***

***Dottoranda***  
***Dott.ssa Emma Iannetti***

***Anno Accademico 2012 – 2013***

## INDICE

<b><i>Introduzione</i></b>	Pag. 2
Epidemiologia	Pag. 4
Agente eziologico: Legionelle	Pag. 6
Habitat, strategie di difesa, crescita ed amplificazione	Pag. 8
Modalità di trasmissione	Pag. 11
Manifestazioni Cliniche	Pag.12
 <b><i>Prevenzione della Legionella in ambiente ospedaliero.</i></b>	
Programma di sorveglianza sanitaria	Pag.15
Caratteristiche dell'Ospedale in oggetto allo studio	Pag. 17
Stato attuale degli impianti	Pag.17
Rete di distribuzione e produzione di acqua calda	Pag.17
Interventi di bonifica	Pag.18
Caratteristiche del Biossido di Cloro nell'Intervento di bonifica	Pag.20
Applicazione in dosaggio continuo del Biossido di Cloro	Pag.21
Obiettivi dell'Intervento	Pag.23
Materiali e Metodi	Pag.24
Risultati	Pag.28
Considerazioni e Conclusioni	Pag.34
BIBLIOGRAFIA	Pag.36

## INTRODUZIONE

Le infezioni sostenute da *Legionella* rappresentano oggi un problema di sanità pubblica per la frequente presenza del microrganismo nell'acqua calda sanitaria e nell'umidificazione degli impianti aerei di case, alberghi, campeggi, centri sportivi, ospedali, case di riposo, ecc., oltre che nelle torri di raffreddamento degli impianti di condizionamento di grandi edifici e in ogni situazione in cui l'acqua ristagna a temperatura di almeno 25°C. Tali infezioni rappresentano infatti una delle nuove emergenze nel campo delle malattie infettive e uno di quei casi che hanno fatto cambiare idea a chi pensava che l'uso di antibiotici, farmaci e l'affermarsi di corretti principi di igiene pubblica avessero portato ormai a una situazione di pieno controllo sulle malattie infettive. La polmonite da *Legionella* (Malattia dei Legionari) è in costante aumento, sia in Italia che in Europa, non solo perché sono sempre più frequenti le occasioni di contatto con il microrganismo ma anche perché c'è maggiore attenzione da parte dei medici alla malattia e la diagnosi è resa più facile dall'introduzione di test rapidi (antigene specifico nelle urine). E' importante però evidenziare che l'aumento è legato a stili di vita e caratteristiche della popolazione che tendono ad amplificare e a favorire la presenza nell'ambiente del microrganismo responsabile, ad aumentare le occasioni espositive, a favorirne la trasmissione all'uomo per l'incremento dei soggetti a rischio. Il controllo della contaminazione ambientale da *Legionella* e la prevenzione della malattia dei legionari non sono facili, in quanto non esistono al momento soluzioni definitive e standardizzate per prevenire la contaminazione ambientale di *Legionella*; pertanto è richiesto un lavoro d'equipe con il coinvolgimento di molte professionalità. Occorre anzitutto osservare con cognizione di causa e studiare le caratteristiche degli impianti e dell'acqua, ed in presenza di contaminazione capirne la dinamica e individuare i punti critici del sistema. Non si deve poi trascurare, soprattutto per le persone a rischio, la possibilità di evitare determinati comportamenti, come l'inutile inconsapevole esposizione a fonti potenziali di contaminazione. Infine, trattandosi di una patologia ambientale e sociale, vanno effettuate anche valutazioni di tipo economico, bilanciando costi e benefici di ogni intervento. Dal punto di vista epidemiologico si osserva l'aumento di dieci volte del numero casi di legionellosi notificati al Registro Nazionale di Sorveglianza dell'Istituto Superiore di Sanità nell'ultimo decennio, che ha spinto le istituzioni sanitarie del nostro paese a porre una maggiore attenzione a questa

malattia infettiva, in termini di elaborazione di nuove linee guida ed istituzione di laboratori dedicati alla diagnosi, sia a livello nazionale che regionale, al fine di garantire un' adeguata e precoce risposta per l' identificazione, il controllo e la prevenzione dei casi.

## **Epidemiologia**

Le infezioni da Legionella sono considerate un problema emergente in Sanità Pubblica tanto che sono sottoposte a sorveglianza speciale da parte dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, dei Paesi Europei e dell'Istituto Superiore di Sanità dove è stato istituito dal 1983 il "Registro nazionale della Legionellosi". Nonostante la particolare attenzione prestata al problema, la reale incidenza della malattia è pressoché sconosciuta e le notifiche dei vari paesi europei rappresentano probabilmente solo una piccola parte del totale di casi imputabili a questo microrganismo. In Europa esiste l'European Working Group for Legionella Infections (EWGLI) che ha organizzato dal 1987 il Sistema per la sorveglianza sulla malattia dei legionari associata ai viaggi. Si tratta di un network europeo che ha lo scopo di individuare casi di infezione da Legionella nei viaggiatori di ritorno, rilevare focolai epidemici e cluster della malattia dei legionari e informare le autorità competenti dei Paesi coinvolti. Il network consente altresì di stimare la frequenza di tutti i casi riportati in Europa. Per esempio, nel biennio 2003-2004 sono stati riportati 9166 casi, dei quali 656 nosocomiali, 3994 comunitari, 1914 associati ai viaggi e 2602 che non è stato possibile classificare<sup>10</sup>. La malattia è associata soprattutto al sesso maschile con un picco di casi tra 60-69 anni per entrambi i sessi. Nell'ultimo decennio nel mondo vi sono stati diversi focolai epidemici, in particolare tra il 1999 e il 2002 di rilievo sono stati quello di Melbourne (Australia) dell'aprile del 2000, quello dei Paesi Bassi del 1999 e infine quello più recente a Murcia (Spagna) nel 2001. Nell'epidemia di Melbourne, la fonte di infezione era stata identificata nella torre di raffreddamento di un acquario di recente costruzione, nell'epidemia scoppiata in Belgio in una vasca parte di una esposizione di una mostra di fiori e ancora una torre di raffreddamento nell'epidemia segnalata in Spagna. Questa è stata l'epidemia più numerosa tra tutte quelle sinora riportate con 449 casi e 6 decessi. In tutti questi episodi il germe responsabile era Legionella pneumophila 1.

In Europa, nel solo biennio 2005 – 2006 si sono verificati 12000 casi di Malattia dei Legionari, di cui 629 (5.3 %) in ambito ospedaliero, e sono stati individuati 214 focolai epidemici (19 nosocomiali) che hanno coinvolto complessivamente oltre 1000 persone (legionella on line).

Le principali sorgenti di infezione sono risultate le torri di raffreddamento, responsabili di 19 epidemie comunitarie, e gli impianti idrici, implicati nello sviluppo di 5 epidemie comunitarie e 15 nosocomiali.

Nel biennio 2007-2008 sono stati invece segnalati 11867 casi, di cui 748 ( 6,3%) nosocomiali, e sono state registrate 243 epidemie ( 28 in ambito ospedaliero) che hanno coinvolto in totale 890 persone.

Attualmente l'incidenza della malattia in Europa è stimata intorno ai 20 casi per milione di abitanti. In Italia, i casi notificati di legionellosi sono raddoppiati ogni anno dal 1998 al 2002, in cui sono stati registrati 639 casi, per poi assestarsi su questi valori nel 2003 e nel 2004 (617 e 604 casi rispettivamente). Si è osservato poi un ulteriore incremento delle notifiche del 40% dal 2004 al 2005 e di circa il 6% dal 2005 al 2006. Nel 2007 sono stati notificati 862 casi di legionellosi, con un'incidenza di 15 casi per milione di abitanti. Il numero di notifiche ha fatto registrare un significativo incremento nel biennio 2008-2009, in cui sono stati segnalati rispettivamente 1189 e 1200 casi di malattia, ed è stata raggiunta un'incidenza di 20 casi per milione di abitanti.

Un importante aumento rispetto al 2008 hanno mostrato in particolare i casi nosocomiali, con un 67% in più di cluster rispetto all'anno precedente ( 25 nel 2009 contro i 15 del 2008). Elevata, inoltre, è rimasta la letalità delle infezioni acquisite in ospedale ( 34% contro il 12% dalla letalità dei casi comunitari).

L'incidenza della legionellosi rimane comunque ancora sottostimata nel nostro Paese, soprattutto nelle Regioni del Sud, dove l'incidenza media della malattia risulta pari a un quarto della media nazionale (5 casi/ 1000000).

La continua segnalazione di casi di legionellosi in ambito nosocomiale e la sempre più frequente comparsa di focolai epidemici in luoghi pubblici molto frequenti ( ad esempio, piscine, palestre, etc.) hanno evidenziato la necessità di promuovere la sorveglianza epidemiologica, di perfezionare le tecniche di identificazione e di introdurre misure preventive, quali la ricerca della sorgente di infezione, il controllo degli impianti di distribuzione dell'acqua potabile e la bonifica degli stessi.

Nel 2000, la Conferenza Permanente per i Rapporti tra lo Stato, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano ha emanato il documento di Linee Guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi, considerando la necessità di attivare sul territorio nazionale le misure di prevenzione e controllo della malattia. Nelle Linee Guida sono descritti gli aspetti epidemiologici, le manifestazioni cliniche, le scelte terapeutiche e le misure preventive in

merito alle infezioni da *Legionella*.

Queste Linee Guida, peraltro, oggetto di prossima revisione, sono state seguite nel 2005 da altri due documenti: uno recante indicazioni ai laboratori con attività di diagnosi microbiologica e controllo ambientale, l'altro più finalizzato a fornire indicazioni ai gestori di strutture turistico-ricettive e termali.

Per quanto attiene la regione Campania ed in particolare la nostra provincia, è in vigore un'Ordinanza Sindacale, la n°224 emanata in data 06.02.2007 dal comune di Napoli avente per oggetto "Attuazione delle misure di prevenzione e gestione del rischio da esposizione a *Legionella* sui sistemi di accumulo e distribuzione, di riscaldamento di acqua e di condizionamento e trattamento dell'aria, relativamente alle strutture turistico – ricettive e ricreative, grossi centri commerciali, presidi nosocomiali pubblici e privati, convitti, stabilimenti termali, saune, piscine, palestre, centri sportivi operanti nella città di Napoli". Tale provvedimento ordina che i titolari della gestione di tale strutture individuino un responsabile per la valutazione e gestione del rischio e per la pianificazione degli interventi documentati in apposito registro di manutenzione ordinaria e straordinaria e dei controlli dei sistemi di condizionamento e/o riscaldamento dell'aria e dell'acqua in modo da minimizzare la probabilità di contaminazione ambientale da *Legionella*.

### **Agente eziologico: *Legionella***

Le *Legionelle* spp. sono batteri Gram negativi strettamente aerobici, non capsulati e non sporulanti. Sono microrganismi generalmente idrofili che colonizzano gli ambienti acquatici naturali e artificiali, in particolare i sistemi periferici di distribuzione dell'acqua calda, e vengono trasmessi principalmente attraverso l'inalazione di aerosol contaminati. Sono caratterizzate da una forma bastoncellare con dimensioni comprese tra gli 0,3  $\mu$ m ÷ 0,9  $\mu$ m di larghezza e 1  $\mu$ m ÷ 5  $\mu$ m di lunghezza. Possiedono uno o numerosi flagelli, mediante i quali possono spostarsi nel loro ambiente. Questi batteri sono capaci di moltiplicarsi all'interno delle cellule, in particolare nelle amebe libere e nei macrofagi umani (parassita intracellulare facoltativo). La famiglia delle Legionellaceae comprende il solo genere *Legionella*.

Attualmente le specie conosciute sono 52 e i sierogruppi determinati sono più di 70. La virulenza varia non solo da una specie all'altra, ma anche all'interno della stessa specie e dello stesso sierogruppo, a seconda del genotipo del ceppo in causa. *Legionella pneumophila* è responsabile della maggior parte delle malattie umane. In tutto il mondo la specie *L. pneumophila* è la più frequentemente implicata nella patologia umana (circa il 90% dei casi) e nell'ambito della specie *pneumophila* (che comprende 15 sierogruppi), il sierogruppo 1 si stima che sia responsabile di oltre l'84% dei casi di legionellosi in Italia, nonché del 95% di quelli contratti in ambito nosocomiale nel 2009 . Molto meno frequentemente sono stati segnalati casi da *L. longbeachae* (3,9%) e *L. bozemanii* (2,4%), mentre altre specie, ancora meno frequenti sono *L. micdadei*, *L. dumoffii*, *L. feelii*, *L. wadsworthii* e *L. anisa* (2,2% in totale). Il sierotipo 1 è stato , inoltre, isolato nel 78,5% dei casi di polmonite da Legionella verificatisi a livello comunitario e nosocomiale in Europa dal 1991 al 2000. Nei restanti casi sono stati isolati i sierotipi 3 e 6 e, meno frequentemente , i sierotipi 4, 5 e 10. Solo in rari casi l'infezione è stata determinata dai sierogruppi 2, 8, 9, 11, 13 e 14, mentre il sierotipo 7 non è mai stato isolato. La distribuzione dei sierogruppi responsabili di legionellosi comunitaria e nosocomiale appare comunque variabile in relazione all' area geografica considerata, con differenze marcate in particolare tra Scandinavia, Regno Unito e area mediterranea. Recenti indagini molecolari dimostrano che nella famiglia delle Legionellaceae esiste una notevole variabilità genetica, accompagnata da variazioni fenotipiche anche all'interno di ceppi geneticamente omogenei.<sup>1</sup> Sono difficilmente coltivabili e richiedono terreni di coltura specifici. Come fonte energetica le Legionelle utilizzano diversi amminoacidi, tra cui cisteina, arginina, isoleucina e metionina e il loro sviluppo è fortemente stimolato da composti del ferro, soprattutto sali, come il pirofosfato ferrico e fattori presenti nell'estratto di lievito. Si distinguono inoltre dalla maggior parte degli altri batteri saccarolitici per la obbligatoria necessità di L-cisteina per la crescita e per la particolare struttura della loro parete cellulare composta in prevalenza da catene di acidi grassi a catena ramificata ed ubiquinoni.

## Habitat, strategie di difesa, crescita ed amplificazione

La Legionella è presente in basse concentrazioni negli ambienti acquatici naturali (laghi, fiumi, sorgenti, acque termali...) ed artificiali (reti di acquedotto pubblico, impianti idrici dei singoli edifici, piscine...) senza che ciò dia luogo ad alcuna patologia (il batterio è presente in concentrazioni spesso non rilevabili analiticamente). Si può trovare anche nel suolo umido e nelle acque marine. Le infezioni possono invece insorgere soltanto quando il batterio prolifera e si porta a concentrazioni elevate in sistemi idrici artificiali che non siano adeguatamente progettati, realizzati e mantenuti. Legionella si sposta dagli habitat naturali per colonizzare gli ambienti idrici artificiali, quali gli acquedotti cittadini e gli impianti idrici, particolarmente quelli che distribuiscono acqua calda, dato che le legionelle hanno una temperatura ottimale di crescita di 37° C. La diffusione ha luogo soprattutto laddove l'acqua calda viene distribuita con sistemi di ricircolo; il problema risulta, pertanto, accentuato in strutture pubbliche e private, quali ospedali, case di cura, grandi alberghi e carceri dove è indispensabile l'adozione di tali sistemi per poter mantenere la temperatura dell'acqua entro i 45°C a tutte le utenze. Gli impianti più a rischio per la diffusione della *Legionella* sono quelli di produzione e di distribuzione dell' acqua calda sanitaria, anche perché le concentrazioni residue di disinfettante presenti nelle reti di distribuzione sono in genere insufficienti a garantire l' assenza del batterio dalle reti idriche. E' stato stimato che la Legionella sia la causa del 20-30% di tutte le polmoniti nosocomiali nonché di uno dei microrganismi che, più frequentemente, sostiene epidemie associate all'acqua in ospedale.

Colonizzano inoltre gli impianti di climatizzazione e le torri di raffreddamento, vasche e fontane, piscine, impianti di irrigazione e cisterne con acqua stagnante. Gli ambienti artificiali agiscono da amplificatori e disseminatori di questi batteri, che in essi trovano le condizioni ideali per proliferare: temperature comprese tra 25 e 42°C, presenza di rami morti nelle tubature, con fenomeni di ristagno e/o ostruzione, presenza di incrostazioni e di sedimenti, ecc., sono tutti fattori che favoriscono la colonizzazione degli impianti da parte di Legionella. La presenza di Legionella è molto frequente nei campioni prelevati negli impianti di acqua calda sanitaria e nel fondo delle cisterne di accumulo, soprattutto nelle reti di distribuzione più estese e nelle cisterne più ampie che per le loro caratteristiche favoriscono il ristagno dell'acqua. Anche la forma delle cisterne di accumulo dell'acqua sembra influire sulla presenza del microrganismo: le cisterne verticali sono più facilmente colonizzate rispetto a



quelle orizzontali.

Inoltre le cisterne nuove (meno di 5 anni) sono generalmente indenni da Legionella, a differenza di quelle più vecchie: questo fenomeno può essere dovuto alle incrostazioni e ai sedimenti che si vengono a formare nei vecchi sistemi dopo anni di uso. La composizione dell'acqua, qualora contenga alte concentrazioni di calcio e magnesio può indurre la formazione di sedimenti su cui facilmente crescono questi batteri. Un elevato quantitativo di ferro nell'acqua favorisce la colonizzazione, mentre alte concentrazioni di rame la prevengono. Accessori da doccia e rubinetteria che permettono all'acqua di rimanere intrappolata all'interno delle rondelle o delle guarnizioni di gomma, possono favorire la crescita di Legionella. La loro sostituzione non sempre elimina la crescita del batterio perché esso può colonizzare diversi materiali, incluso il PVC, l'acciaio inossidabile, il legno e anche, seppure in misura minore, il rame.<sup>2</sup> I batteri diventano pericolosi quando sussistono contemporaneamente le seguenti condizioni<sup>3</sup>: La facilità con cui Legionella si riproduce nell'ambiente naturale, in contrasto con la difficoltà a crescere sui terreni di coltura artificiali, è in buona parte dovuta alla capacità di questo batterio di moltiplicarsi all'interno di protozoi ciliati. In natura infatti le legionelle vivono e si moltiplicano all'interno di protozoi (amebe e ciliati) che costituiscono una fonte di nutrimento e di protezione dalle condizioni ambientali sfavorevoli, grazie anche alla capacità delle amebe di produrre forme di resistenza come le cisti. Sono state individuate ben 14 specie di amebe a vita libera, tra cui Acanthamoeba, Hartmannella e Naegleria, due specie di ciliati del genere Tetrahymena, e una specie di muffa gelatinosa che fungono da serbatoio per la moltiplicazione e la sopravvivenza delle legionelle. Il ruolo cruciale del rapporto Legionella-protozoo, sia nell'ecologia che nella patogenesi di questo microrganismo, può essere dedotto da numerose osservazioni. In uno studio sperimentale è emerso che in presenza di condizioni ambientali sfavorevoli, come ad esempio bassa temperatura (4° C) o mancata disponibilità di nutrienti, la capacità di sopravvivenza di Legionella pneumophila viene potenziata dalla presenza di amebe. Inoltre, quando Legionella si trova all'interno del protozoo, in particolare nella forma cistica, risulta protetta da sostanze chimiche e biocidi usati per disinfettare l'acqua; e al riparo da eventuali condizioni avverse come disidratazione, temperature elevate, variazioni di osmolarità e pH, e questo potrebbe spiegare la sua persistenza in acque trattate al calore o disinfettate. Tra l'altro quando il germe si trova all'interno del protozoo diffonde facilmente negli aerosol e quindi viene più facilmente inalato. In aggiunta, l'adattamento di Legionella a sopravvivere all'interno

dell'ameba sembra contribuire alla sua virulenza, perché facilita l'insorgenza di malattia e rende il germe più resistente agli antibiotici.<sup>4</sup>

*L. Pneumophila* sembra che possa sopravvivere all'interno di biofilm anche in assenza dell'ameba, sebbene il protozoo rimanga in ogni caso necessario per la moltiplicazione. In ogni caso, la riproduzione intracellulare rimane la modalità preferita per proliferare all'interno di un biofilm, meglio se in presenza di un'alta concentrazione di batteri eterotrofi. Si può quindi supporre che anche i batteri acquatici possano influenzare positivamente o negativamente la sopravvivenza di *Legionella*. Molti batteri di origine idrica possono ad esempio esprimere un'attività inibente nei confronti di *Legionella pneumophila*, grazie alla possibilità di produrre batteriocine o Bacteriocin-Like Substances (BLS), molecole di natura proteica dotate di potere inibente nei confronti di microrganismi appartenenti alla stessa specie o strettamente correlati. Questo aspetto merita una considerazione particolare per un possibile futuro utilizzo di tali microrganismi produttori nel controllo della diffusione del patogeno.<sup>5</sup> Comunque è proprio negli aggregati costituiti da altri batteri, alghe, polimeri e sali naturali che la legionella trova il supporto indispensabile per vivere e svilupparsi. Studi d'alto livello sulla natura e caratteristiche dei biofilm sono stati e sono tuttora condotti presso l'Università di Stato del Montana (MSU), che dispone di uno specifico centro di ricerca: il CBE (Center for Biofilm Engineering).

Pertanto, senza entrare troppo nei dettagli, va considerato che i biofilm si sviluppano dove ci sono i necessari supporti di ancoraggio, sostanze nutritive e adeguate temperature; condizioni che, ad esempio, si possono trovare nelle torri evaporative o nei tubi che convogliano acqua calda con velocità basse, cioè con velocità che non ostacolano con turbolenze l'ancoraggio e la crescita dei biofilm. La presenza di biofilm, inoltre, può comportare errori rilevanti nel determinare i livelli di contaminazione degli impianti. Infatti, durante le operazioni di misura, i biofilm possono rompersi (per forti sbalzi termici, improvvise turbolenze o urti meccanici) e liberare grandi quantità di batteri che, di fatto, alterano in modo considerevole l'effettivo livello di contaminazione dell'impianto. Pertanto le misure ottenute non sono sempre sicure e nei casi dubbi devono essere rifatte<sup>6</sup>.

## **Modalità di trasmissione**

Legionella si trasmette generalmente per inalazione di aerosol contaminati che si possono formare sia spruzzando l'acqua che facendo gorgogliare l'aria in essa, o per impatto sulle superfici solide. Le goccioline più pericolose sono quelle di piccole dimensioni (diametro inferiore ai 5 micron) in quanto possono penetrare più facilmente nelle basse vie aeree. La capacità del batterio di sopravvivere nell'aerosol è quindi essenziale per la sua patogenicità ed è legata sia a fattori propri, quali il metabolismo, che a fattori ambientali quali l'umidità relativa: per esempio, la sopravvivenza di Legionella passa da 3 a 15 minuti quando l'umidità aumenta dal 30% all'80%. I primi casi di malattia sono stati associati alla contaminazione degli impianti di climatizzazione, mentre le infezioni più recenti derivano dalla contaminazione dei sistemi di distribuzione dell'acqua e dalle torri evaporative. Episodi sporadici e/o clusters epidemici sono stati segnalati in ospedali, case di cura, studi odontoiatrici, alberghi, campeggi, impianti termali e ricreativi (palestre, piscine, idromassaggi), navi da crociera, giardini e campi da golf con sistemi d'irrigazione a spruzzo e/o fontane decorative. Va tuttavia sottolineato che non è stato dimostrato un maggior rischio di malattia in coloro che abitano in ambienti contaminati, quindi la malattia rimane un evento molto raro, soprattutto tra le persone sane. Inoltre in circa il 60% dei casi di origine comunitaria non si riesce a risalire alla fonte d'infezione ambientale, e questo è presumibilmente dovuto alle molteplici occasioni di esposizione. In ospedale, oltre ai sistemi di distribuzione dell'acqua, i sistemi di condizionamento, gli endoscopi, le attrezzature per la respirazione assistita e gli apparecchi per aerosol e ossigenoterapia possono costituire una riserva di Legionella.

In letteratura sono riportati rari casi d'infezione in neonati nati con parto in acqua o infettati in ospedale, nonché in pazienti con ferite chirurgiche, a causa di aspirazione, instillazione e/o aerosolizzazione di acqua contaminata durante la terapia respiratoria. Non è mai stata dimostrata la trasmissione interumana. Quindi ricapitolando l'acqua può formare goccioline di piccole dimensioni (5 µm) che, se trascinate dall'aria, possono veicolare la Legionella, mentre il batterio non è trasportato dal vapore anche se l'acqua è contaminata poiché le dimensioni delle gocce d'acqua che costituiscono il vapore sono modeste e tali da non essere un efficace veicolo per il batterio.<sup>7</sup>

## Manifestazioni cliniche

Una volta penetrate in un ospite suscettibile attraverso le mucose delle prime vie respiratorie, le legionelle raggiungono i polmoni dove vengono fagocitate dai macrofagi alveolari, che però non sono in grado di ucciderle o di inibirne la crescita. *Legionella* riesce infatti a evitare l'effetto dei meccanismi con cui i fagociti eliminano i microrganismi patogeni e si moltiplica all'interno di questi fino a provocarne la lisi, con il conseguente rilascio di altre legionelle che possono infettare altre cellule. Alla base della patogenesi delle legionelle vi è quindi la loro capacità di moltiplicarsi all'interno dei macrofagi alveolari. Il ciclo vitale delle legionelle nei macrofagi umani è stato ampiamente caratterizzato. Le legionelle entrano nelle cellule per fagocitosi e, una volta all'interno della cellula, si trovano dentro un vacuolo specializzato che non viene attaccato dagli enzimi dei macrofagi deputati all'eliminazione degli agenti patogeni. Sfuggendo alla via di eliminazione batterica dei macrofagi, *Legionella pneumophila* è in grado di replicarsi all'interno del suo ospite e ne esce efficacemente dopo aver provocato la morte della cellula ospite. Le infezioni causate da *Legionella* vengono indicate con il termine generale di "legionellosi" e si presentano in forma di polmonite o in forma febbrile extrapolmonare o in forma subclinica. La *Malattia dei Legionari* è la forma più severa dell'infezione, con una letalità media del 10%, che può arrivare fino al 30-50% nel caso di infezioni ospedaliere, e si presenta come una polmonite acuta difficilmente distinguibile da altre forme di infezioni respiratorie acute delle basse vie aeree. Il periodo d'incubazione dura da 2 a 10 giorni, anche se in alcuni pazienti immunodepressi è stata osservata un'incubazione più lunga, fino a 3 settimane. La malattia esordisce con i seguenti sintomi:

febbre alta ( $>39^{\circ}\text{C}$ )

cefalea

mialgie

- tosse lieve non produttiva che si accentua al comparire dei sintomi respiratori

Un terzo circa dei pazienti presenta diarrea e vomito, sintomi cardiaci e neurologici; il 50% mostra alterazioni dello stato di coscienza e delirio ma non segni di meningismo. L'esame radiologico del polmone non consente di distinguere la polmonite da legionelle dalle altre polmoniti, ma è utile per il monitoraggio della terapia in quanto un adeguato trattamento porta a una

diminuzione dell'infiltrato. Come complicanze della Malattia dei Legionari possono insorgere ascesso polmonare, insufficienza respiratoria, shock, coagulazione intravasale disseminata, porpora trombocitopenica e insufficienza renale.

La Febbre di Pontiac è una condizione epidemica simil-influenzale che deve il proprio nome a un'epidemia che si verificò nell'omonima località del Michigan (USA) nel 1968, in seguito alla dispersione di aerosol contaminato da *Legionella pneumophila* 1 da un impianto di condizionamento dell'aria. La Febbre di Pontiac compare dopo un'incubazione media di 24-48 ore ed è caratterizzata da:

febbre

brividi

cefalea e malessere

- a volte tosse e arrossamento della gola I sintomi durano in genere 2-5 giorni e poi si risolvono da sé. Non vi è un coinvolgimento polmonare e neppure radiologico. L'infezione da *Legionella* può manifestarsi anche in forma subclinica, cioè senza comparsa di sintomi clinici, e si evidenzia solo con il riscontro di anticorpi anti-*Legionella* spp in assenza di episodi di polmonite e/o forme simil-influenzali.<sup>8</sup>

## **Prevenzione della Legionella in ambiente ospedaliero.**

La contaminazione degli ambienti ospedalieri merita particolare attenzione, data la maggiore suscettibilità a contrarre la malattia nei pazienti ospedalizzati, soprattutto immunocompromessi o sottoposti a terapie intensive <sup>14</sup>. Il grado di contaminazione ospedaliera è stato correlato con l'incidenza di casi di legionellosi nosocomiali; i rapporti CDC<sup>14</sup> e le Linee Guida sulla prevenzione della Legionellosi<sup>21</sup> sono di aiuto per la valutazione degli interventi da effettuare in caso di positività di *Legionella* spp. Nell'ambiente, anche se esistono difficoltà oggettive nella stima del rischio reale di infezione: le Linee Guida Italiane indicano che concentrazioni uguali o superiori 10000 (UFC/L) rappresentano il limite oltre il quale intervenire con la bonifica ambientale, mentre Linee Guida di altri Paesi Europei suggeriscono che le misure devono essere intraprese quando i livelli raggiungono 1000 UFC/L. Anche per quanto riguarda le strategie di prevenzione ed intervento nel caso di contaminazione da parte di *Legionella* spp. negli impianti, esistono diversi metodi ampiamente descritti in studi pubblicati in letteratura; la scelta del metodo più appropriato dipende dalle caratteristiche della struttura e dalla complessità della rete idrica o dal materiale delle tubazioni che può interferire con l'azione disinfettante.

L'adozione di misure preventive e di controllo, anche se costose, appare giustificata dal fatto che la malattia viene diagnosticata raramente. Ciò dipende da un mancato accertamento di tutti i casi e per questo la frequenza della malattia può essere sottostimata. Come già sottolineato, i casi sono drammaticamente sottostimati nell'Italia meridionale, ed in particolar modo nella nostra regione, nonostante due considerazioni:

1. rispetto a pochi anni fa le indagini di laboratorio e di microbiologia hanno reso più facile la ricerca e la identificazione del batterio, rendendo la diagnosi più sensibile e specifica ed a costi più accessibile.
2. esistono allo stato attuale efficaci misure preventive e di controllo in grado di minimizzare la contaminazione delle matrici ambientali e le susseguenti infezioni da legionella.

Preoccupa ancora di più la considerazione che molti degli ospedali sorvegliati in Campania risultano fortemente contaminati, e pertanto è molto verosimile la comparsa di casi sporadici o di clusters epidemici.

Sulla base di tale premesse, il Dipartimento di Scienze Mediche Preventive dell' AOU Federico II di Napoli, ha condotto un monitoraggio ambientale nella medesima Azienda Ospedaliera Universitaria per valutare l'andamento nel tempo della contaminazione da *Legionella pneumophila*, in rapporto a vari trattamenti di bonifica effettuati nel periodo 2007-2011 e chiarire aspetti relativi al suo contenimento o eliminazione

## **Programma di sorveglianza sanitaria.**

E' stato eseguito un monitoraggio ambientale nell'AOU che conta oltre 1200 posti letto. La scelta della metodica più appropriata dipende, previa attenta valutazione dei costi-benefici, dalle caratteristiche della struttura in cui si intende operare (ad esempio reparti a rischio di un ospedale presentano problematiche diverse rispetto ad uno stabilimento termale o ad un albergo), dell'impianto idrico e dell'acqua stessa (ad esempio la complessità ed il materiale di costruzione delle tubazioni possono impedire l'azione di un disinfettante, così come pH, temperatura e torbidità dell'acqua possono ridurre l'efficacia). Gli interventi di bonifica adottati sono stati differenti (iperclorazione, shock termico, clorazione continua, lampade a raggi UV, applicazione filtri), per cui è stato possibile confrontarne gli effetti e paragonarne l'efficacia.

L'Azienda Ospedaliera presa in esame, ha messo in atto una strategia per la prevenzione e il controllo della Legionellosi, basata sulla stesura di un programma di sorveglianza nato dalla collaborazione tra la Direzione Sanitaria, il Dipartimento di Scienze Mediche Preventive, l'Ufficio Tecnico e la Microbiologia clinica.

Tale programma si pone i seguenti obiettivi:

- 1) Valutare la diffusione del microrganismo nell'ambiente della rete idrica;
- 2) Determinare il livello di contaminazione della rete idrica nei diversi edifici della struttura sanitaria;
- 3) Definire il rischio di infezione corrispondente al livello di contaminazione;
- 4) stimolare i medici a prendere in considerazione le infezioni da legionella nella diagnosi differenziale delle infezioni delle basse vie respiratorie;
- 5) fornire uno strumento operativo per facilitare l'accertamento dei casi;
- 6) individuare le scelte strategiche e le misure preventive e di controllo più appropriate attraverso la valutazione dei risultati ottenuti dalle indagini ambientali ed in base alle risorse disponibili;
- 7) Stimare l'efficacia dell'attuazione del programma di sorveglianza ambientale come

strumento indispensabile per programmare gli interventi di bonifica necessari alla riduzione del rischio<sup>9</sup>.

Il piano di autocontrollo e di sorveglianza messo a punto è riassumibile in due momenti fondamentali:

- Monitoraggio delle matrici ambientali. Rilevazione analitica periodica (ogni sei mesi) delle concentrazioni di legionella nei punti critici della rete di distribuzione e nei reparti con i degenti più a rischio dell'Azienda (in tutto vengono monitorati 15 edifici, i boiler di ciascuno di essi, i serbatoi)
- Protocollo di Manutenzione e Bonifica: in collaborazione con l'Ufficio Tecnico, vengono messe in atto tutte quelle procedure tese alla prevenzione delle possibili cause e condizioni che favoriscono la sopravvivenza e la moltiplicazione dei batteri. I sistemi di riscaldamento, ventilazione e condizionamento dell'aria e i loro componenti, così come l'acqua potabile, possono favorire e amplificare la diffusione di sostanze aerodisperse. In particolare gli adempimenti routinari dell'Ufficio Tecnico sono:
  - evitare la formazione di ristagni d'acqua;
  - provvedere ad effettuare la pulizia periodica degli impianti;
  - sostituire periodicamente rubinetteria e altre parti terminali
  - limitare la possibilità di nicchie biologiche per i microrganismi attraverso la pulizia degli impianti, la prevenzione e la rimozione dei sedimenti dai serbatoi d'acqua calda, bacini di raffreddamento e altre misure igieniche;
  - mantenere efficienti i separatori di gocce montati a valle delle sezioni di umidificazione;
  - controllare lo stato di efficienza dei filtri ed eliminare l'eventuale presenza di gocce d'acqua sulle loro superfici;
  - controllare, ove possibile, la temperatura dell'acqua in modo da evitare l'intervallo critico per la proliferazione dei batteri (25-55°C).



## **Caratteristiche dell'Ospedale in oggetto allo studio**

L'Azienda in esame è costruita su di un'area di 40 ettari e rientra nella tipologia a padiglioni collegati da due gallerie di servizio e da una viabilità principale e secondaria. Tale struttura consta di 19 edifici, ognuno comprendente uno o più dipartimenti e conta 1270 posti letto.

### **STATO ATTUALE DEGLI IMPIANTI**

L'impianto idrico sanitario viene alimentato dalla rete idrica cittadina da due punti.

Il primo alimenta a pressione di rete gli edifici 1, 2, 3, 4; l'altro alimenta un serbatoio da 1000 m<sup>3</sup> costituito da due vasche uguali di cui una è fuori servizio. Da questo, attraverso pompe di sollevamento, viene alimentato il serbatoio di piezometrica e da qui, per gravità, tutti i restanti fabbricati.

I serbatoi hanno accesso diretto ed esclusivo dall'esterno.

La compensazione dei volumi dovuta alle modifiche di livello nei serbatoi avviene attraverso grate di ferro; quella relativa al serbatoio di piezometrica è munita di un filtro per trattenere le polveri.

I serbatoi sono realizzati in calcestruzzo cementizio armato e sono impermeabilizzati all'interno, permettono un controllo delle pareti laterali e, allo stato, presentano perdite di lieve entità.

### **LA RETE DI DISTRIBUZIONE**

La rete di distribuzione segue un percorso a grandi maglie in modo da permettere l'alimentazione di ogni fabbricato da due punti. E' costituita da tubazione di vario materiale (ghisa sferoidale, acciaio catramato, acciaio zincato) e vari organi di intercettazione permettono il fermo di alcuni tratti della condotta per poter intervenire in caso di guasto.

Dalla rete vengono alimentati direttamente, e quindi alla stessa pressione, gli impianti antincendio, mentre la pressione dell'acqua potabile a servizio degli edifici viene ridotta a circa 4 barr con apposite apparecchiature poste alle due estremità est-ovest degli edifici.

Nei vari fabbricati le tubazioni di distribuzione principale si sviluppano dal piano cantinato e attraverso montanti alimentano le utilizzazioni ai vari piani.

### **PRODUZIONE DELL'ACQUA CALDA**

Dalla rete fredda vengono alimentati i boiler (preparatori di acqua calda) installati nelle

sottocentrali termiche dei fabbricati e l'acqua prodotta dai citati preparatori (fluido primario acqua surriscaldata) ad una temperatura di oltre 60°C, viene successivamente miscelata per portare la temperatura a circa 40°C. Per permettere una pronta immissione alla temperatura predetta, l'impianto è realizzato a circuito con tubazione di mandata e ritorno.

L'impianto, dunque, è singolare per la presenza di serbatoi di grande volume e per la presenza di tratti in cui la circolazione dell'acqua può essere nulla. Analoghi tronchi si possono avere nelle reti di distribuzione secondarie a seguito di dismissione di utilizzazioni o per un mancato utilizzo delle stesse.

## **INTERVENTI DI BONIFICA**

E' emersa più volte la necessità di effettuare interventi di bonifica.

Si è cercato sempre di scegliere l'intervento più adatto alle caratteristiche dell'impianto, alla rete di distribuzione e alla produzione di acqua calda.

La struttura in oggetto risale agli anni 70 e gli impianti sono quelli originali. E' stato possibile effettuare interventi di sanificazione spinta quali shock termico e iperclorazione così come riportati dal Documento di Linee Guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi (G.U. n. 103 del 05/05/00). Sul sistema idrico inizialmente si è intervenuto tramite interventi di sanificazione dei becchi erogatori ed aumento della temperatura dell'acqua calda sanitaria e successivamente con un processo di iperclorazione.

Queste metodiche non sono state sufficienti per le condutture di acqua calda a contenere l'elevata contaminazione microbica di legionella, pertanto sono in fase di sperimentazione soluzioni alternative compatibili con le risorse disponibili. Tenendo presente la complessità della struttura a poliblocco dell'Azienda si è convenuto con la Direzione Sanitaria e il personale dell'Ufficio Tecnico, sulla necessità di adottare contemporaneamente diversi tipi di interventi in maniera tale da sperimentarne l'efficacia e ottenere una significativa diminuzione della carica di legionella in tutta l'Azienda con particolare attenzione alle zone più a rischio.

Nel corso di questi anni pertanto sono state applicate e valutate nel tempo diverse tipologie di interventi attraverso la stretta collaborazione tra la Direzione Sanitaria, il personale addetto al controllo delle infezioni ospedaliere e gli addetti alla conduzione e manutenzione degli impianti idrici.

La mancanza di un mezzo efficace al 100% per la bonifica del sistema idrico rappresenta uno dei punti deboli di ogni strategia di controllo della legionellosi e ha indotto alcune strutture

sanitarie a dotarsi di sistemi di disinfezione in continuo. Nell'Azienda in esame alla fine del 2004 è andato in funzione un sistema di Clorazione Continua tramite l'applicazione di un impianto per il dosaggio automatico di ipoclorito di sodio nell'acqua distribuita in rete. Il vantaggio di questo metodo è una modalità di disinfezione generale che garantisce una concentrazione residua del disinfettante in tutto il sistema di distribuzione dell'acqua in modo da minimizzare la colonizzazione della legionella nei punti distali. Lo svantaggio è legato al fatto che il cloro è corrosivo e può provocare danni alle tubature. Inoltre, la quantità di cloro residuo prevista (1-3 mg/l) è difficilmente compatibile con gli standard attuali dell'acqua potabile sia come disinfettante residuo che come presenza di sottoprodotti. L'impianto è ubicato all'interno della sala pompe sottoposta al serbatoio di rilancio verso la vasca di carico ed è costituito da tre pompe dosatrici elettromagnetiche a membrana, dotate di dispositivi divisori elettronici per ottenere una regolazione del quantitativo di ipoclorito immesso.

Da febbraio 2006 tale metodologia è stata associata a un intervento che prevede l'effettuazione dello Shock Termico sull'intera rete idrica della struttura secondo quanto previsto dalle "Raccomendations of CDC and Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee"<sup>10</sup>. Sono quattro le fasi di cui si compone:

1. innalzamento della temperatura dei boilers a 71-77 °C con predilezione dell'orario notturno;
2. attivazione delle pompe di ricircolo per distribuire l'acqua così surriscaldata anche nella rete di distribuzione fino ai rubinetti;
3. mantenimento delle condizioni di cui ai punti precedenti per circa 30 minuti;
4. ritorno graduale alle condizioni di esercizio.

Attraverso valutazioni in itinere ottenute da monitoraggi microbiologici ambientali gli interventi di bonifica, periodicamente ripetuti, sono stati adattati alle specifiche caratteristiche strutturali ed organizzative dell'Azienda ed associati alle regolari misure di manutenzione nonché al mantenimento della temperatura dell'acqua al di fuori dell'intervallo critico di 20-50°C. Durante l'intervento, eseguito nelle ore notturne, gli operatori tecnici addetti, con la collaborazione del personale medico e paramedico di guardia, utilizzano come riferimento la piantina dell'edificio e riportano su di essa tutti i punti acqua bonificati e le temperature raggiunte a livello terminale.

## **CARATTERISTICHE DEL BIOSSIDO DI CLORO NELL'INTERVENTI DI BONIFICA**

A partire dal 2007, si è sperimentato con successo all'interno dell'azienda policlinico l' utilizzo del biossido di Cloro come disinfettante.

Svolgendo un'azione prettamente ossidante, il biossido di Cloro differisce dal cloro gas e dai suoi derivati soprattutto per quanto riguarda l'interazione con le sostanze organiche presenti nell'acqua ed, essendo la sua azione disinfettante prettamente ossidativa che clorurante, l'origine e la formazione di sottoprodotti è assai più contenuta.

Non presentando l'inconveniente della formazione dei Trialometani il biossido di Cloro rappresenta un agente ossidante e disinfettante di grande interesse; va tuttavia ricordato che, sia a causa di una serie di reazioni di decomposizione che ad uno dei reagenti utilizzati per la sua sintesi, il biossido di Cloro in acqua genera il sottoprodotto Clorito, elemento per il quale esistono prove di rischio per la salute umana anche se non sono state evidenziate caratteristiche cancerogene.

Il biossido di Cloro come agente chimico rispetto al cloro e all'ipoclorito di Sodio, presenta diversi vantaggi:

- Insensibilità al valore del PH delle acque da trattare;
- Potente capacità di distaccamento del biofilm stratificato sulla superficie interna delle tubature
- Nessuna reazione con composti azotati per formare Cloroamine;
- Potere ossidante 2.5 volte maggiori rispetto al Cloro;
- Azione battericida a bassi dosaggi;
- Assenza di formazione di composti Alometanici;
- Azione disinfettante pretrattante ossidante e non clorurante.

La grande capacità disinfettante del biossido di Cloro non è oltretutto legata a fattori dipendenti da tempi di contatto o valori di concentrazione, ( aspetti pratici che hanno sempre limitato l'uso dei prodotti cloroderivati come disinfettanti), in quanto la sua azione ossidante, anche a bassi dosaggi, comincia immediatamente al contatto ed in maniera selettiva sia sulla carica microbica presente sia sul materiale organico disciolto o sospeso nelle acque, risultando tutto disponibile alla disinfezione senza subire influenze per valori di PH.

Il Biossido di Cloro, infatti, agisce con la stessa forza ossidante in ambiente acido o basico, a differenza, per esempio dell'Ipoclorito di Sodio, la cui attività è molto influenzata dall'ambiente in cui si opera, riducendosi fino al 50% circa in acque tendenzialmente basiche.

Il biossido di cloro è il mezzo più efficace per la rimozione di biofilm, Legionella e altri batteri

patogeni. Essendo un gas che viene rilasciato nell'aria è in grado di penetrare nelle strutture protettive dei microorganismi permettendo non solo un'inibizione crescita biofilm ma anche la sua graduale rimozione. In questo modo il vantaggio principale è la sua conformità alle normative relative all'acqua potabile e la possibilità di un dosaggio continuo. Concentrazioni molto piccole possono essere disinfestate dalla Legionella a medio e a lungo termine. L'eccellente effetto deposito del Biossido di cloro protegge le tubature non utilizzate in maniera continua. L'efficienza della lotta alla Legionella con biossido di cloro dipende in maniera assoluta da un'ottimizzazione dei diversi gradi di concentrazione in punti diversi nel sistema idrico trattato. Sia la concentrazione del biossido di cloro che del clorito, essendo prodotti derivati, viene dosata con sensori. E' possibile garantire quindi valori conformi alle normative vigenti.

Il biossido di Cloro ( $\text{ClO}_2$ ) a temperatura ambiente è un gas giallo verdastro, più denso dell'aria, con una solubilità in acqua molto elevata, superiore a quella del Cloro e dell'Ozono. Il  $\text{ClO}_2$  è un forte ossidante con un buon potere battericida, virucida, sporicida e algicida.

La complicazione maggiore del biossido di Cloro è che deve essere prodotto in loco attraverso dei macchinari generatori e dosatori che sono notoriamente molto complicati e soprattutto pericolosi perché generano un prodotto chimico in stato gassoso<sup>11</sup>.

E' noto che la produzione del biossido di Cloro può avvenire attraverso varie reazioni. Le due applicazioni chimiche più note sono:

la prima mediante reazione del clorito di Sodio con Cloro, ovvero:

$2\text{NaClO}_2 + \text{Cl}_2 \rightarrow 2 \text{Na Cl} + \text{ClO}_2$ , che non ha trovato applicazione industriale a causa dello stoccaggio e pericolosità del cloro gassoso;

la seconda è la reazione del Clorito di Sodio con Acido Cloridrico:

$5 \text{NaClO}_2 + 4 \text{HCl} \rightarrow 4 \text{ClO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} + 5\text{NaCl}$ , in cui non si ha la formazione di composti organoclorurati.

In Italia il primo processo non ha trovato diffusione per la difficoltà di gestire un gas pericoloso come il Cloro. Inoltre, eventuali residui di questo gas reagendo con la sostanza organica dell'acqua da trattare si trasformano in Trialometani.

Per contro, il secondo processo ha trovato una larga e generalizzata applicazione soprattutto per la praticità di utilizzo nei confronti del primo. Un altro fattore che, tuttavia, ne ha permesso la diffusione è stata la mancanza di valide alternative che risolvessero i problemi legati alla bassa efficienza di conversione Clorito-Biossido (teorica 80%) e alla bassa sicurezza

intrinseca dei generatori ( accumulo di soluzione di biossido). Ciò è dovuto soprattutto all'impossibilità di conseguire un alto livello di efficacia nella conversione chimica senza dover ricorrere ad eccessive dosi di acido ed alla produzione di sottoprodotti indesiderati.

Affinché sia garantita una alta efficienza delle reazioni, c'è bisogno di un attento dosaggio delle quantità dei reagenti. L'AOU Policlinico utilizza il metodo Twin Oxide che è in grado di generare una soluzione di biossido di cloro con purezza del 100% in una soluzione allo 0,3%. Non rilascia sottoprodotti come Clorati e Cloriti, non è esplosivo e ha un lungo tempo di dimezzamento cinetico. La soluzione 0.3% può anche essere trasportata con qualsiasi mezzo di trasporto senza alcun pericolo o rischio.

La sostanza biocida attiva è il biossido di Cloro stesso ( $\text{ClO}_2$ ) che è almeno 10 volte più potente del Cloro e dei disinfettanti a base di cloro e funziona ad ampio spettro di pH, da 4 a 10; non genera sottoprodotti nocivi e non ha effetti collaterali. Il biossido di cloro dalla ditta, è fornito come kit bicomponente in polvere che, una volta aggiunto ad un volume d'acqua specifico, reagisce in una soluzione al Biossido di Cloro puro al 99,9% con un tempo di dimezzamento cinetico di 30-60 giorni. L'elevato potere disinfettante del biossido di Cloro si ottiene senza sotto prodotti, effetti collaterali o pericoli indesiderati. L'impatto ambientale è trascurabile in quanto, una volta usato, il prodotto residuo è soltanto un po' di sale. I reagenti in polvere sono facili da trasportare separatamente( trasporto stradale, marittimo ed aereo), è facile da maneggiare( rispetta il foglio dei dati di sicurezza) ed è semplice da applicare( con attrezzature di dosaggio disponibile standard senza reagente).

### ***Metodologia di diluizione del Biossido di Cloro: applicazione in dosaggio continuo.***

Nella fase di "attacco" al biofilm la maggior parte del dosaggio di biossido di cloro diluito in rete viene proprio assorbito per il distaccamento del biofilm e in rete si troveranno dei valori residuali molto bassi. Nel momento in cui il dosaggio aggressivo ha distaccato tutto il biofilm presente il suo assorbimento diminuisce e quindi si iniziano ad avere dei valori residuali in rete sempre più alti. Questo è il segnale di conferma che il Biossido di Cloro attivo ha terminato il suo lavoro di distacco del biofilm. L'esperienza suggerisce che questa prima fase può durare per i primi 3/5 giorni.

Passata questa iniziale fase di aggressione del biofilm si inizia a scendere con dei dosaggi meno aggressivi( da 1,0ppm in 3 giorni a 0.9 ppm ed in una settimana ad 0.7 ppm) ma comunque utili all'abbattimento delle cariche e dei frammenti di biofilm liberati dalla fase di

aggressione.

Rimane ovviamente frequente il controllo del comportamento del biossido di Cloro attraverso la verifica della residualità del prodotto in rete. Generalmente questa fase può durare per 15 giorni e la sua efficacia la si evince anche dal fatto che le cariche in sospensione iniziano ad avere una soddisfacente e costante diminuzione e non più fluttuante.

Terminata questa fase si dà avvio all'ultima parte di dosaggio il cui obiettivo non è più di abbattimento visto che il biossido di Cloro introdotto nelle fasi precedenti ha già svolto questo compito bensì di mantenimento e di copertura dalla possibile riattivazione del biofilm biologico nell'impianto idrico cosa che scatenerrebbe le problematiche per cui è stato richiesto il trattamento chimico.

Il dosaggio da diluire in continuo individuato per una copertura dell'impianto è di 0.3 ppm.

## **OBIETTIVI DELL'INTERVENTO**

Gli obiettivi di tale intervento sono stati i seguenti:

1. Determinazione del tipo e dell'entità della contaminazione da legionella nel sistema idrico e di condizionamento della struttura prima e dopo l'effettuazione della bonifica così concepita.
2. Valutazione dell'efficacia dell'associazione degli interventi di bonifica a medio e lungo termine.
3. Individuazione delle criticità percepite come più rilevanti.

Oltre ai prelievi semestrali da effettuare come da protocollo su tutti gli edifici sottoposti a sorveglianza sono stati effettuati ulteriori campionamenti sugli edifici che di volta in volta vengono trattati con lo shock termico. Un primo controllo viene effettuato subito dopo il trattamento e poi i successivi a distanza di due mesi per verifica della bonifica l'efficacia nel tempo <sup>12</sup>.

I risultati dei prelievi di controllo sono stati confrontati con quelli effettuati precedentemente e l'efficacia e l'opportunità del trattamento vengono valutate anche alla luce degli effetti a lungo termine dello stesso.

Inoltre sono state valutate:

1. l'entità della contaminazione da legionella prima e dopo il trattamento di bonifica, sia da un punto di vista qualitativo che quantitativo.
2. la distribuzione dei vari sierotipi di legionella negli edifici prima e dopo la bonifica
3. gli effetti dei trattamenti sul sistema idrico.

## MATERIALI E METODI

Sono stati individuati dei punti di controllo ambientale, con frequenza periodica e in base all'effettuazione degli interventi di bonifica<sup>13</sup>.

Il programma ha previsto la seguente procedura metodologica:

- Ispezioni e prelevamento di campioni ambientali con frequenza semestrale.
- Registrazione delle visite ispettive con indicazione di data e struttura ispezionata.
- Procedure ispettive per i reparti a rischio: l'unità responsabile si reca presso i reparti a rischio per procedere all'ispezione utilizzando le schede di rilevazione specifica.
- I punti sottoposti al campionamento ambientale sono stati scelti sia sulla base della struttura dell'impianto sia in rapporto al rischio teorico di formazione di aerosols con possibile disseminazione di legionella<sup>14</sup>.

### Modalità di prelievo

La Legionella viene ricercata nell'ambiente idrico artificiale (impianti idrici) limitando i prelievi ai reparti di degenza che maggiormente possono essere critici sia in base alla struttura dell'impianto, sia in funzione dei dati epidemiologici. I campioni sono rappresentati dall'acqua del rubinetto o della doccia del circuito dell'acqua calda e di quello dell'acqua fredda, qualora la temperatura sia superiore a 20°C<sup>15</sup>.

Il volume di acqua prelevato è di 2 litri per campione. Per la ricerca di *Legionella* si preleva dal circuito dell'acqua calda, senza flambare al punto di sbocco, a meno che la ricerca non sia quantitativa, e si raccoglie l'acqua in recipienti sterili nei quali viene aggiunto sodio tiosolfato ad una concentrazione finale di 0.01% , nel caso in cui essa contenga cloro. Tutte le operazioni vengono eseguite osservando le precauzioni necessarie alla tutela della salute dell'operatore (mascherine, guanti, occhiali). All'atto del prelievo, il recipiente sterile viene aperto in modo da non contaminare la parte interna del tappo a vite che va a contatto con il campione prelevato, e viene repentinamente chiuso al termine dell'operazione.

Il primo litro di campione viene raccolto senza far scorrere l'acqua, il secondo litro viene invece prelevato dopo averla fatto scorrere per qualche minuto; in tal modo è possibile avere sia l'aliquota di acqua concentrata nel tratto terminale del rubinetto, sia quella proveniente da distretti più distali.



A fine prelievo viene effettuata la misurazione della temperatura e del cloro residuo, due parametri suscettibili di sensibili variazioni durante le procedure di conservazione e trattamento del campione.

La temperatura viene presa con un comune termometro di vetro al mercurio che possa consentire la valutazione dell'intervallo critico per la proliferazione di legionella (25-55°C). La determinazione del cloro residuo (presente in acqua come cloro libero, ioni ipocloroso e ioni ipoclorito), è stata effettuata con un apparecchio per la misurazione istantanea.

## **Trasporto**

I campioni vengono trasportati in contenitori frigo portatili al riparo dalla luce e vanno consegnati al laboratorio in tempo utile affinché l'analisi venga iniziata non oltre 24 ore dal prelievo. In laboratorio essi vengono sottoposti a:

- registrazione

- analisi per la ricerca qualitativa e quantitativa del batterio legionella su specifici terreni di coltura

- eventuali prove biochimiche che possano essere d'aiuto per l'identificazione.

Protocollo analitico per legionella, ricerca della carica batterica, procedure di isolamento e identificazione seguono le indicazioni del Documento di linee guida per la prevenzione e controllo della legionellosi. (G.U. n. 103 del 05/05/00)

I risultati vengono poi trascritti, trasmessi alla Direzione Sanitaria e archiviati.

## **Terreni di coltura**

La nostra ricerca prevede l'utilizzo di un terreno selettivo per Legionella<sup>17</sup>.

- **Legionella CYE Agar Base**

Il terreno Legionella CYE Agar Base (Oxoid) è selettivo per Legionella, contiene carbone attivo, che gli conferisce il caratteristico colore nero, ed è privo del supplemento di crescita (L-cisteina). Al terreno CYE agar viene aggiunto il supplemento nutritivo BCYE- $\alpha$  Medium. Al terreno così ottenuto si può aggiungere una fiala GVPC Selective supplement (precedentemente riconosciuto), per ottenere il terreno selettivo GVPC Selective Medium oppure una fiala di MWY Selective supplement ottenendo così l' MWY –  $\alpha$  Selective Medium. Questi terreni vengono distribuiti in piastre Petri e conservati al riparo dalla luce in ambiente adeguatamente refrigerato (4 C).

### Protocollo analitico per Legionella

I campioni d'acqua vengono concentrati con la tecnica delle membrane filtranti( come previsto dalle Linee guida del 4-4-00) usando membrane di estere di cellulosa con porosità di 0.2 micron(Millipore). Dopo la filtrazione, le membrane vengono prelevate con pinzette sterili e poste in un contenitore sterile con tappo a vite contenente 7 ml della stessa acqua non filtrata. I depositi ( batteri e materiale organico) presenti sulla membrana devono essere risospesi mediante agitazione energica su vortex per qualche minuto. Una parte della sospensione (2 ml) viene trattata a 50 C per 30 minuti in bagnomaria al fine di eliminare gli eventuali altri microrganismi presenti nel campione e far sopravvivere solo le legionelle.

Dai campioni trattati e non trattati così ottenuti vengono prelevati 0.10 ml che vengono posti su due piastre di terreno selettivo per *Legionella* contenente L-cisteina necessaria per la sua crescita: MWY- $\alpha$  Selective Medium e GVPC Selective Medium. Entrambi contengono glicina, polimixina B e vancomicina: la glicina indebolisce la parete batterica facilitando l'azione degli antibiotici, la polimixina B inibisce la crescita dei batteri Gram-negativi mentre la vancomicina agisce contro i gram-positivi. Ambedue i terreni sono addizionati con antibiotici che agiscono contro i lieviti: il terreno MWY contiene anisomicina, invece GVPC cicloeximide.

Le piastre vengono poi incubate a 36-37 C in aerobiosi in ambiente umido con il 2.5% di CO<sub>2</sub>; Il campione concentrato viene conservato a 4 C. Giornalmente le piastre vengono esaminate, si considera una piastra come negativa solo dopo aver osservato una assenza di crescita per 10 giorni di incubazione.

Tutte le colonie con morfologia sospetta: dimensioni variabili da una punta di spillo fino a 3-4 mm di diametro, superficie convessa, forma rotonda con margini netti, colore bianco lucente, spesso bordato da un anello iridescente di colore blu, vengono sottoposte a identificazione presuntiva per subcultura su CYE agar base privo di cisteina, sul quale le Legionelle non possono crescere.

Il terreno CYE agar base, infatti, non contiene cisteina; le colonie sospette, quindi, cresciute su MWY e su GVPC, ma non cresciute su CYE non sono Legionella.

### Isolamento e identificazione

Tutte le colonie con morfologia sospetta cresciute su MWY- $\alpha$  Selective Medium e GVPC Selective Medium vengono subcolturate in doppio su BCYE-  $\alpha$  Medium completo di supplemento di crescita e su CYE Agar Base privo di supplemento. Le subculture vengono

incubate a 37 C in ambiente umido con 2.5% di CO<sub>2</sub> per 48 ore. Le colonie di *Legionella* crescono sul terreno completo (BCYE) e non su terreno base (CYE) che non contiene cisteina, per cui tutte le colonie su BCYE-  $\alpha$  Medium e non su CYE Agar Base vengono ritenute *Legionella spp*

L'identificazione presuntiva a livello di specie viene fatta utilizzando tecniche di agglutinazione al lattice, con antisieri specifici.

Il test di agglutinazione al lattice, Legionella Latex Test, sfrutta particelle di lattice blu sensibilizzate con anticorpi di coniglio che agglutinano in presenza di antigeni specifici della parete cellulare di legionella, formando un precipitato visibile a occhio nudo.

Questo metodo di screening consente in tempi rapidi il riconoscimento dei sierotipi delle specie patogene di *Legionella* isolate: allo stato attuale esistono in commercio antisieri relativi a 14 differenti sierotipi di *Legionella*.

Il sierogruppo 1 è considerato il più patogeno ed è responsabile della maggiore quantità di casi di malattia.

Il kit per il test contiene tre reagenti che consentono l'identificazione separata di *Legionella pneumophila* sierogruppo 1, *Legionella pneumophila* sierogruppi da 2 a 14 e di altre specie patogene di Legionella. Esso contiene inoltre la sospensione di Controllo Positivo che è una sospensione polivalente di cellule di legionella in soluzione tamponata; la sospensione di Controllo Negativo che è una sospensione di cellule di *Legionella spiritensis* in soluzione tamponata, non reattive con i reagenti del test; il lattice di controllo costituito da particelle di lattice blu sensibilizzate con globuline di coniglio, non reattive con i reagenti del test; la soluzione salina tamponata (pH 7.3) e i cartoncini di reazione monouso.

Per il test di agglutinazione si prelevano con un'ansa da 4 a 10 colonie con la medesima morfologia e si stemperano in una provetta contenente 0.4 ml di soluzione salina (0.85% NaCl). La sospensione cellulare viene passata al vortex per 5 secondi e viene prelevata con una pipetta automatica tarata a 250  $\mu$ l. Questa aliquota viene distribuita all'interno di ciascuno dei quattro cerchi predisposti sul cartoncino di reazione e viene mescolata con la goccia di ciascun reagente al lattice (3 reagenti test e il reagente di controllo). Si ruota delicatamente il cartoncino di reazione per circa un minuto e si osserva l'eventuale agglutinazione: il risultato è positivo se interviene l'agglutinazione delle particelle di lattice blu entro un minuto e non si verifica agglutinazione nell'area di controllo. Una reazione positiva indica che nel campione sono stati individuati gli agenti di un determinato sierogruppo delle specie di *Legionella*.

## Interpretazione dei dati

Secondo le linee guida per la prevenzione ed il controllo della Legionellosi predisposte dal Ministero della Sanità, la valutazione del rischio di contrarre la malattia è suggerita dalle seguenti concentrazioni:

- Presenza di una concentrazione di legionelle fino a  $10^2$  UFC/L (assenza di casi): *presenza limitata, non è necessario alcun intervento*
- Presenza di una concentrazione di legionelle compresa tra  $10^3$ - $10^4$  UFC/L: *contaminazione, si potrebbero verificare casi sporadici.*
- Presenza di una concentrazione di legionelle  $> 10^4$  UFC/L: *contaminazione importante.*

## RISULTATI

Dal 2002 nell'Azienda Ospedaliera sono cominciati controlli routinari sull'acqua calda sanitaria per la ricerca di Legionella attraverso l'effettuazione di prelievi random con cadenza semestrale su tutti gli edifici (un prelievo per edificio).

Da settembre 2004 è in funzione un sistema di Clorazione Continua che ha assicurato da allora l'aumento della concentrazione di cloro immessa nella rete idrica fino a un valore di 0,2 mg/l. I risultati di tale applicazione hanno evidenziato una netta diminuzione della concentrazione di Legionella sirogruppi 2-14, che in tutti i campionamenti successivi alla bonifica è risultata assente. La concentrazione media di Legionella sierotipo 1 non ha subito variazioni significative. La Legionella spp, invece, ha subito, immediatamente dopo la bonifica, una leggera diminuzione della carica media, ma già al secondo campionamento post-bonifica i valori sono nuovamente aumentati, mantenendo quindi l'andamento oscillante riscontrato anche prima del trattamento.

Per quanto riguarda la distribuzione di Legionella dopo la bonifica si è osservato un aumento del numero di edifici contaminati dal sierotipo 1 in contrapposizione a una completa assenza del sierogruppo 2-14 e una diminuzione della Legionella spp. Ciò si spiega con la resistenza al cloro che sviluppa nel tempo la Legionella Pnemophila sierotipo 1, in accordo con quanto riportato in letteratura.

In seguito a questi risultati è sorta la necessità di associare più sistemi di bonifica per contrastare questo tipo di contaminazione. Pertanto da febbraio 2006 la clorazione continua è stata supportata da un intervento che prevede l'effettuazione dello Shock Termico sull'intera rete idrica della struttura secondo la metodica già descritta<sup>18</sup>.

I prelievi di controllo sono stati effettuati subito dopo e a due mesi dalla bonifica. Dato il particolare andamento altalenante delle concentrazioni della legionella, in grado di annidarsi in biofilm e amebe, e la non precisa conoscenza delle caratteristiche dell'impianto idrico dell'edificio, non è stato facile associare la variazione della carica contaminante agli effetti della bonifica. Dai risultati si evince comunque che la contaminazione, quasi sempre ridottasi subito dopo l'intervento, aumenta nuovamente a distanza di due mesi. Il problema allora è quello di cercare di mantenere a lungo termine gli effetti dello shock che viene pertanto successivamente associato a mantenimento costante della temperatura dell'acqua calda a 55°C e a una appropriata e continua manutenzione degli impianti (sostituzione filtri, tubi flessibili delle docce, decalcificazione di elementi meno usurati etc.)<sup>19</sup>. Nel corso del 2006 e del 2007 gli shock termici continuano in tutti gli edifici del policlinico e vengono ripetuti con cadenza mensile a seconda dei risultati ottenuti, cioè in base alla riduzione della carica batterica ottenuta. Essi vengono inizialmente effettuati sull'intera rete idrica di ogni edificio e a seconda della carica iniziale presente possono durare 1 o più giorni. Successivamente in seguito alla individuazione di criticità specifiche e resistenti vengono effettuati shock termici selettivi, cioè sulla singole montanti contaminate<sup>20</sup>.

Nel corso del 2007 sono stati effettuati 270 campioni di acqua calda sanitaria:

- 150 campioni sono risultati positivi (55.5%)
- la maggior parte dei campioni positivi era contaminato dal sierogruppo 1 (90.6%)
- il 21.3% dei campioni positivi superava la concentrazione di 10.000 ufc/l

Nel corso del 2008 sono stati effettuati 470 prelievi di acqua calda sanitaria:

- 296 campioni sono risultati positivi (62%)
- La maggior parte dei campioni positivi era contaminato dal sierogruppo 1 (92%)
- Il 23% dei campioni positivi superava la concentrazione di 10.000 ufc/l

Nel periodo 2007-2008 sono stati effettuati in tutto circa 740 campioni di acqua calda sanitaria dai diversi reparti dell'Azienda. Di questi 446 sono risultati positivi (60%). La maggior parte dei campioni positivi era contaminato dal sierogruppo 1 (92%).

Il 25% dei campioni positivi superava la concentrazione di 10.000 UFC/L.

Nel corso del 2007 lo shock termico è stato effettuato su 173 punti:

- subito dopo il trattamento sono state rinvenute cariche notevolmente ridotte, anche se il 53.2% dei campioni è risultato comunque positivo
- Il 18.5% dei campioni positivi presentava cariche superiori a 10.000 ufc/l

Nel corso del 2008 lo shock termico è stato effettuato su circa 120 punti

- subito dopo il trattamento sono state rinvenute cariche notevolmente ridotte, anche se circa il 50% dei campioni è risultato comunque positivo
- Il 15% dei campioni positivi presentava cariche superiori a 10.000 ufc/l

Nel periodo 2007-2008 lo shock termico è stato effettuato su circa 293 punti

- subito dopo il trattamento sono state rinvenute cariche notevolmente ridotte, anche se circa il 50% dei campioni è risultato comunque positivo
- Il 15% dei campioni positivi presentava cariche superiori a 10.000 ufc/l

I livelli di contaminazione registrati hanno imposto nuove strategie di azione. Accanto alla effettuazione periodica degli shock termici (sull'intera rete idrica e selettivi), la clorazione continua, gli interventi di manutenzione ordinaria e straordinaria, il mantenimento della temperatura dell'acqua calda sanitaria al di sopra del range critico, sono stati attuati trattamenti con biossido di cloro, trattamenti mediante vapore umido sotto pressione, utilizzo di specifica apparecchiatura produttrice di acqua ozonata. Tra questi, il trattamento più efficace è risultato quello con il *biossido di cloro*. Questo metodo è stato inizialmente sperimentato su un edificio campione resistente per poi applicarlo ad altri edifici con valori critici di contaminazione.

Sono stati campionati 12 punti presso un singolo edificio che presentava prima del trattamento un'alta contaminazione da legionella. Su 10 punti campionati, il 100% risultava positivo con il 57% di campioni superiori 10.000 UFC/L. Subito dopo il trattamento risultava positivo un solo punto con concentrazioni inferiori a 1000 UFC/L. A distanza di due mesi dal trattamento con biossido la percentuale di positività risaliva al 100% con 3 punti superiori a 10.000 UFC/L. Si è associato pertanto un trattamento con shock termico che riduce a uno i punti con concentrazioni superiori a 10.000 UFC/L e riduce l'entità della contaminazione degli

altri punti. A distanza di circa un mese sono risulti positivi solo due punti su 7 e in concentrazioni di gran lunga inferiori ai valori critici. A distanza di due mesi sono risultati positivi 5 punti su 7 in concentrazioni di gran lunga inferiori al valore critico.

Dai risultati ottenuti, associati ai vantaggi pratici che si hanno dall'utilizzo di questo disinfettante, si è continuata la sperimentazione dell'utilizzo del biossido di cloro, su tutti gli edifici del Policlinico, e si sono valutati i risultati.

A partire gennaio 2007 ad oggi sono stati esaminati 11 edifici presenti all'interno dell'azienda Universitaria Policlinico con biossido di cloro. In questo arco di tempo sono stati effettuati campionamenti pre e post trattamento e sono stati prelevati in totale 904 campioni .

L'efficacia della metodica è stata valutata su n. 2 edifici cioè l' ed1 e l'ed 10.

In questi due edifici, considerando il monitoraggio con il biossido di cloro, sono stati individuati ed effettuati 126 punti di prelievo. Si è andato a valutare la carica media totale dei prelievi e la deviazione standard prima del trattamento. Si è poi valutata la carica media totale dei prelievi e la deviazione standard dopo il trattamento a 1,2,3,4,5 e 6 mesi ( tabella ).

Il sierotipo di legionella isolato è stato esclusivamente di tipo 1.

Si è poi valutata l'efficacia della metodica nei restanti edifici in cui sono stati effettuati i prelievi, cioè ed. 2, ed 5, ed. 6, ed. 7, ed. 8,ed. 9, ed. 11, ed. 14,ed. 15. Il numero dei punti di prelievo prima del trattamento con il biossido di cloro sono stati 61, dopo il trattamento sono stati 67.

Di tutti gli edifici, si è andato a valutare la carica media totale dei prelievi prima del trattamento, con la deviazione standard e la carica media totale dei prelievi e deviazione standard dopo il trattamento.

Il sierotipo di legionella isolato è prevalentemente di tipo 1, qualcuno è stato di tipo spp , mentre per l'edificio 6 è stato isolato esclusivamente Legionella di tipo 6.

In alcuni edifici, nonostante le cariche batteriche non superassero le concentrazioni critiche (>10.000 ufc/l), si è segnalato ai Direttori del dipartimento, la necessità di mettere in atto misure a lungo termine per controllare la concentrazione batterica esistente e per prevenire la colonizzazione degli impianti.

L'attività di sorveglianza condotta dal nostro Dipartimento ha evidenziato che La maggior parte delle strutture sanitarie monitorate è risultata contaminata da *Legionella sp1*;L'ulteriore conferma dell'efficacia a breve termine di qualsiasi intervento di bonifica sottolinea l'importanza del monitoraggio continuo delle strutture, della ripetizione periodica del trattamento, nonché della corretta applicazione dello stesso. L'efficacia di qualsiasi

intervento di bonifica è ridotta se non è supportato da una corretta e periodica manutenzione degli impianti.

Carica M totale    pre-trat    1m    2m    3m    4m    5m    6m

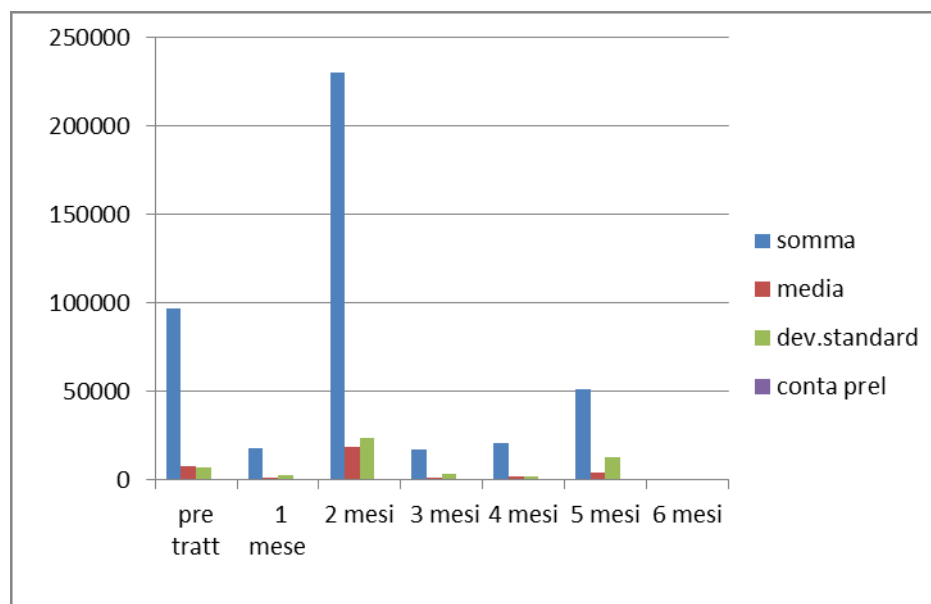
Car M	Ed A	8108	1533	19166	1458	1918	4308	933
Dev stan		7069	2779	23870	3782	2462	12825	
n. campioni		12	12	12	12	12	12	12
Car M	Ed B	2541	37	15987	10600	5242	900	1057
Dev stand		22199	74	26779		7776	2337	1089
n. campioni		7	7	7	7	7	7	7

Tab 1

Carica media totale dei 84 prelievi effettuati ed 1 e 42 prelievi dell'ed. 10.

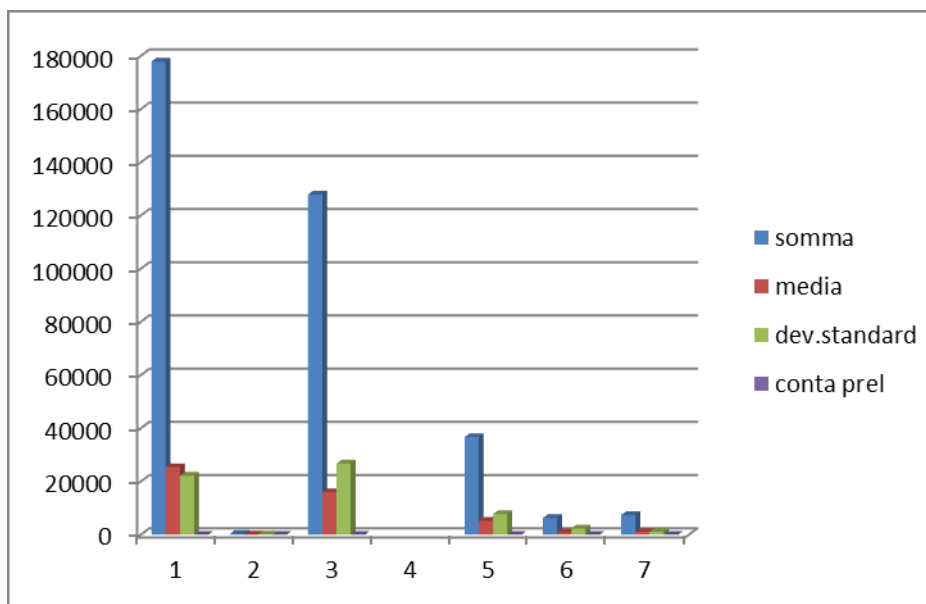
Ed A = ed 1

Ed B = ed 10



Edificio 1.





Edificio 10

Dai risultati si evince come il numero di campionamenti effettuati nel corso degli anni sia progressivamente aumentato, indice di un sistema di sorveglianza sempre più accurato; si è osservata poi una diminuzione del numero dei campioni positivi per Legionella e in particolare di quelli contaminati con cariche superiori a 10.000 UFC/L. C'è da dire comunque che diversi fattori rendono difficile l'interpretazione dei risultati ambientali:

1. la dose minima infettante è sconosciuta
2. la legionella può essere presente anche in assenza di casi
3. non è stabilita una correlazione tra l'entità della contaminazione e il rischio di sviluppare la malattia
4. l'analisi batteriologica è solo una stima puntuale della situazione: la concentrazione di legionella può variare in base al momento del campionamento e da un punto a un altro
5. la specie riscontrata nell'acqua non necessariamente è patogena
6. l'aerosolizzazione dell'acqua è importante quanto le ufc/l ma questo parametro è difficilmente misurabile.

Il monitoraggio periodico e costante del livello di contaminazione resta comunque il sistema di controllo più efficace della concentrazione del batterio nel sistema idrico.

## CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti da questi anni di sorveglianza si prestano a una serie di considerazioni.

Il fatto che più o meno periodicamente dopo l'applicazione dei sistemi di bonifica la concentrazione di *Legionella* nei punti contaminati torni a livelli elevati non deve meravigliare. In effetti sono note le difficoltà che si incontrano quando si interviene su condutture, soprattutto se obsolete, il cui materiale delle tubazioni può impedire a volte l'azione del cloro, in cui questi microrganismi si sono stabilmente insediati. Gli impianti vecchi sono ricchi di rami morti e spesso presentano sacche dove i mezzi di bonifica possono giungere con difficoltà e consentono la sopravvivenza e la proliferazione del batterio. Costituiscono praticamente il serbatoio da cui il batterio potrà ricominciare la ricolonizzazione dell'impianto già dopo pochi giorni dalla bonifica.

La replicazione all'interno dei protozoi, inoltre, assicura la sopravvivenza di *Legionella* anche in condizioni avverse, quali variazioni di temperatura, osmolarità, pH e mancata disponibilità di nutrienti; dopo la replicazione intracellulare il patogeno, mostra un'aumentata resistenza agli stress ambientali ed ai biocidi e questo potrebbe spiegare la sua persistenza in acque trattate al calore o con disinfettate.

Tuttavia gli sforzi per ottenere la riduzione della contaminazione vanno ripetuti, attuando nuovi interventi di bonifica eventualmente associati tra loro e alla periodica manutenzione degli impianti che riveste un ruolo basilare, per cui deve essere ottimizzata e responsabilizzata.

Appare evidente che l'obiettivo generale nell'ambito di tale problematica sia quello di contenere il rischio e minimizzare il numero di casi di legionellosi agendo prioritariamente sulle situazioni più critiche, sia con interventi preventivi che possano ridurre la presenza e la concentrazione della legionella, sia con efficaci provvedimenti di controllo nel momento in cui si ha evidenza di casi di malattia.

E' stato quindi necessario effettuare interventi di bonifica programmati e mirati al fine di impedire l'innalzamento delle cariche del microrganismo oltre i limiti raccomandati dalle Linee Guida Italiane per il controllo della legionellosi: tutti i metodi di bonifica attuati, ad eccezione del biossido di cloro, sono risultati in vario modo efficaci nel breve periodo, ma non altrettanto nel medio/ lungo termine. L'utilizzo di più metodi in contemporanea ha avuto, in taluni casi, un effetto sinergico che ha fatto sì che le concentrazioni di *Legionella* rimanessero sotto il valore soglia auspicato. L'impiego di metodi di bonifica universalmente utilizzati come iperclorazione e aumento della temperatura non garantisce un intervento radicale e definitivo anche se reiterato in tempi ravvicinati, soprattutto per particolari strutture ospedaliere con impianti idrici

complessi o molto estesi.

Al momento, solo l'utilizzo del *biossido di cloro* ha permesso un contenimento delle cariche a valori inferiori a 100ufc/l, che permane nel tempo. L'azione del biossido di cloro sembra mantenere un effetto maggiormente protettivo nelle tubazioni, ma tale efficacia dovrà essere dimostrata anche per periodi più lunghi. Rimane l'auspicio della possibilità di mantenere l'efficacia del trattamento nel tempo pur continuando la disinfezione con concentrazioni non elevate di biossido di cloro (0.30 mg/l), al fine di evitare la formazione di sottoprodotti indesiderati (cloriti e clorati) e la corrosione delle tubature a causa di lunghe esposizioni.

In conclusione, la scelta del metodo più appropriato dipende dalle caratteristiche della struttura e della complessità della rete idrica.

Solo sperimentalmente è possibile trovare i sistemi più efficaci per ogni specifica struttura, che, attenendosi comunque alle indicazioni delle linee guida internazionali e nazionali (aggiornate di anno in anno con le indicazioni derivate dalle esperienze delle singole regioni), tengano conto delle caratteristiche della struttura in cui si intende operare.

Data la natura ubiquitaria di *Legionella pneumophila* e le difficoltà pratiche che si riscontrano nel tentativo di eliminarla, l'unica misura efficace rimane la sorveglianza attenta e combinata con un intervento rapido ed equilibrato che tenga conto anche dell'analisi costi/benefici.

## BIBLIOGRAFIA

- <sup>1</sup> **Stefania Boccia, Paola Borella, Erica Leoni, Patrizia Messi, Maria Teresa Montagna, Sabrina Pignato, Vincenzo Romano Spica, Maria Triassi, Carla Maria Zotti**  
[http://www.ricercaitaliana.it/grandi\\_temi/dettaglio\\_sezione-189.htm](http://www.ricercaitaliana.it/grandi_temi/dettaglio_sezione-189.htm) -Portale Nazionale della Ricerca Italiana (MiUR)-
- <sup>2</sup> **Stefania Boccia, Paola Borella, Erica Leoni, Patrizia Messi, Maria Teresa Montagna, Sabrina Pignato, Vincenzo Romano Spica, Maria Triassi, Carla Maria Zotti**  
[http://www.ricercaitaliana.it/grandi\\_temi/dettaglio\\_sezione-191.htm](http://www.ricercaitaliana.it/grandi_temi/dettaglio_sezione-191.htm) -Portale Nazionale della Ricerca Italiana (MiUR) –
- <sup>3</sup> **Marco e Mario Doninelli dello studio S.T.C.** -Rivista Idraulica -n. 23 Novembre 2002.
- <sup>4</sup> Attività di Prevenzione e controllo della “Legionellosi”- Atti di indirizzo Studio Campione della contaminazione ambientale. Provvedimento n562 del 16/07/2002. Settore Prevenzione, Assistenza Sanitaria, Igiene Sanitaria in Campania, G.R.C.
- <sup>5</sup> **Stefania Boccia, Paola Borella, Erica Leoni, Patrizia Messi, Maria Teresa Montagna, Sabrina Pignato, Vincenzo Romano Spica, Maria Triassi, Carla Maria Zotti**  
[http://www.ricercaitaliana.it/grandi\\_temi/dettaglio\\_sezione-193.htm](http://www.ricercaitaliana.it/grandi_temi/dettaglio_sezione-193.htm) -Portale Nazionale della Ricerca Italiana (MiUR)-
- <sup>6</sup> **Marco e Mario Doninelli dello studio S.T.C.** -Rivista Idraulica -n. 23 Novembre 2002
- <sup>7</sup> **Cesare Maria Joppolo -Luca Molinaroli** -Politecnico di Milano “Legionella, impianti idrici e condizionamento” – Congresso “Il rischio della legionellosi Misure di controllo e prevenzione” Milano 26/10/2007
- <sup>8</sup> **Stefania Boccia, Paola Borella, Erica Leoni, Patrizia Messi, Maria Teresa Montagna, Sabrina Pignato, Vincenzo Romano Spica, Maria Triassi, Carla Maria Zotti**  
[http://www.ricercaitaliana.it/grandi\\_temi/dettaglio\\_sezione-194.htm](http://www.ricercaitaliana.it/grandi_temi/dettaglio_sezione-194.htm)
- <sup>9</sup> **Habicht W, Muller HE:** Occurrence and parameters of frequency of Legionella in warm water systems of hospital and hotels in Lower Saxony. Zbl Bakt Hyb B 1988; 186(1): 79-88.
- <sup>10</sup> **Ruggenini Moiraghi A., Castellani Pastoris M., Benedetti P.:** “Epidemiologia e prevenzione della legionellosi in Italia”. Federazione Medica, XLIII: 721-726, 1990
- <sup>11</sup> **Hamilton E, Seal DV, Hay J.:** Comparison of chlorine dioxide disinfection for control of Legionella in a hospital potable water suppl. J Hosp Infect 1996;156-9
- <sup>12</sup> **G.A. Gagnon, J.L. Rand, K.C. O Leary, R.C. Andrews:** Disinfectant efficacy of chlorine dioxide in drinking water biofilms. Water Research 39 (2005) 1809- 1817;
- <sup>13</sup> **Marina Tesauero, Annalisa Bianchi, Michela Consonni, Fabrizio Pregliasco and Maria Gabriella Galli:** Sorveglianza ambientale di *Legionella pneumophila* e metodi di bonifica a confronto in strutture sanitarie di Milano ( risultati di un quinquennio) Ann Ig 2007; 19: 533-540

<sup>14</sup> Conferenza Permanente Stato- Regioni 04-04-2000, trasmesso dal Ministero della sanità. Documento di linee-guida per la prevenzione e il controllo della legionellosi. Gazzetta Ufficiale n. 103 del 05/05/00.

<sup>15</sup> **Marina Tesauero, Annalisa Bianchi, Michela Consonni, Fabrizio Pregliasco and Maria Gabriella Galli:** Environmental surveillance of *Legionella pneumophila* in two Italian hospitals. Ann Ist Super Sanità 2010 Vol. 46, No. 3: 274-278

<sup>16</sup> **Maria Cristina Rota, Maria Grazia Caporali, Maria Scaturro e Maria Luisa Ricci** Rapporto Annuale sulla Leggionellosi in Italia

<sup>17</sup> **Marina Tesauero, Annalisa Bianchi, Michela Consonni, Fabrizio Pregliasco and Maria Gabriella Galli:** Environmental surveillance of *Legionella pneumophila* in two Italian hospitals. Ann Ist Super Sanità 2010 Vol. 46, No. 3: 274-278

<sup>18</sup> Rota MC, Ricci ML, Caporali MG, Salmaso S. La legionellosi in Italia nel 2006. Rapporto annuale. Notiziario ISS, 2008.

<sup>19</sup> **Casari, A. Ferrario, A.Montanelli:** Prolonged effect of two combined methods for Legionella disinfection in a hospital water system; Ann Ig 2007; 19: 525-532

<sup>20</sup> Piani di Sorveglianza controllo Legionellosi. Nota 141736/05 del 17/02/05 del Settore Prevenzione, Assistenza Sanitaria, Igiene Sanitaria in Campania, G.R.C

<sup>21</sup> **Ditommasso S, Biasin C, Giacomuzzi M, Zotti CM, Ruggenini A, Moiraghi A.** Dip. Sanità Pubblica e Microbiologia, Università degli Studi di Torino. Giornale Italiano delle Infezioni Ospedaliere, vol 10, n. 1, Gennaio- marzo 2003, pag 7-24.